

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
FÜÜSIKA INSTITUUT

Renata Muru
FEOFÜTIIN A EKSTRAHEERIMINE JA
SPEKTROSKOOPIA

Bakalaureusetöö

Juhendajad: PhD Margus Rätsep
Prof Arvi Freiberg

Tartu 2013

SISUKORD

SISSEJUHATUS	3
1. Ülevaade uurimisvaldkonnast	4
1.1. Feofütiin a molekulaarne struktuur	4
1.2. Klorofüll a ja feofütiin a fotosüsteem II-s	5
1.3. Selektiivne spektroskoopia	6
1.3.1. Homogeenne ja mittehomoogeenne laienemine	6
1.3.2. Spektraalsälgamine ja selektiivselt ergastatud fluorestsents	8
2. Materjalid ja meetodid	10
2.1. Feofütiin a ekstraheerimine	10
2.2. Kasutatud mõõtesüsteemid	13
3. Tulemused ja arutelu	16
3.1. Feofütiin a neeldumis- ja kiirgusspektrid ning nende peegelsümmeetria	16
3.2. Neeldumis- ja kiirgusspektri temperatuurisõltuvus	19
3.3. Selektiivne ergastusspekter	22
3.4. Spektraalsälgatud spekter	25
3.4.1. Mõjuspekter	26
4. Kokkuvõte	28
VIITED	30
SUMMARY	32
Tänuavaldused	34
LISAD	35
Lisa 1	35

SISSEJUHATUS

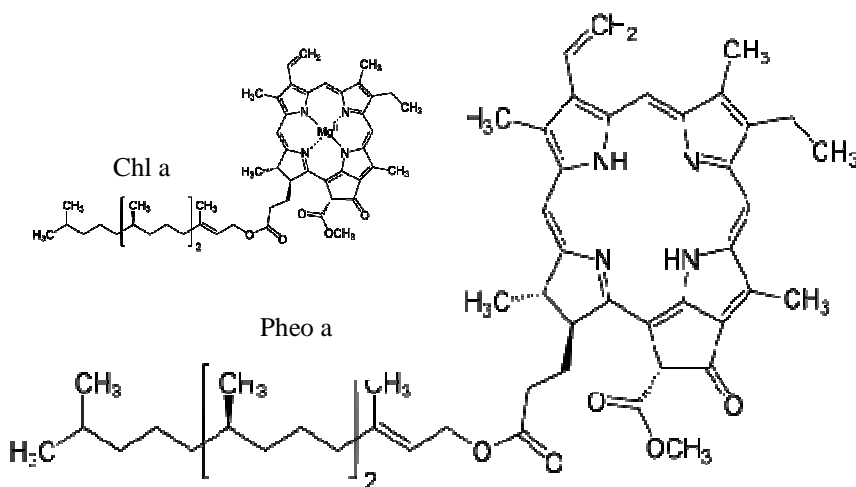
Fotosüntees on suurema osa maailma hapniku ja organismidele kättesaadava energia allikas. Seetõttu on fotosüsteemide uurimine juba pikka aega mitmetes teadusharudes aktuaalne olnud. Feofütiin a-d peeti varasemalt lihtsalt klorofüllilise laguproduktina, mistõttu ei olnud selle uurimisest huvitatud, kuid peagi selgus, et feofütiin a on taimedes, vetikates ja tsüanobakterites toimiva fotosüsteemi II oluline komponent, kus see täidab esimese elektronilekandja rolli. Nüüdseks on feofütiin a tähtsuse valguses hakatud seda jälle lähemalt uurima, kuid teostatud on ainult väheseid spektraalseid mõõtmisi. Seetõttu seati käesoleva töö põhieesmärgiks põhjalik feofütiin a spektri uurimine erinevatel temperatuuridel.

Spektri uurimist tuli alustada feofütiin a valmistamisest, sest see ei ole kaubanduslikult kättesaadav. Uurimuse esimeseks etapiks planeeriti madaltemperatuurseteks mõõtmisteks piisava puhtusastmega feofütiin a ekstraheerimise meetodi välja töötamine. Feofütiin a valmistamist alustati 2011. aasta kevadel ning intensiivse töö tulemusena sai spektroskoopilisi mõõtmisi alustada juba sama aasta sügisel. Käesolev töö esitab valiku tehtud mõõtmistest.

1. Ülevaade uurimisvaldkonnast

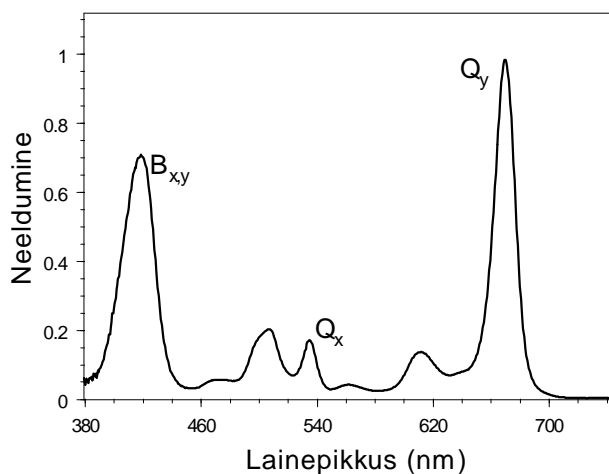
1.1. Feofütiin a molekulaarne struktuur

Feofütiini võib tõlgendada kui klorofüllil molekuli, mille porfüriiniringist puudub keskne Mg^{2+} ioon (joonis 1). Klorofüllist saab magneesiumi eemaldada kuumutamise või nõrga happega töötlemise teel. Seetõttu on feofütiinil vähemalt sama palju vorme kui klorofüllil, millest tuntumad on feofütiin a ja feofütiin b.



Joonis 1. Feofütiin a ja klorofüll a struktuurid. Allikas: Wikimedia Commons. Autor: Yikrazuul.

Feofütiin a (Pheo a) neeldumisspektri (joonis 2) iseloomustamisel lähtutakse enamasti Goutermani nelja orbitaali mudelist [1]. Selle teooria kohaselt arvestatakse ainult kahte



Joonis 2. Feofütiin a neeldumisspekter toatemperatuuril trietüülamiinis.

kõrgeimatele hõivatud energiatasemetele vastavat molekulaarset orbitaali (LUMO) ja kahte madalaimatele mitteasustatud energiatasemetele vastavat orbitaali (HOMO). Põhiolekus molekuli ergastamise korral tekib seega neli spektririba, mis vastavad võimalikele elektronkonfiguratsioonidele. Neid ribasid nimetatakse tavaliselt Q_x , Q_y , B_x ja B_y , kusjuures siinsel juhul on B_x ja B_y

eristamatud, jäädes nn Soret' riba sisse. Näeme ka, et tegelikult on feofütiin a neeldumisspektris rohkem kui neli maksimumi, seega tuleb spektri kirjeldamisel arvestada ka võnkemoodidega seotud neeldumisribadega, mille põhjustavad elektron-võnkeinteraktsioonid. [2]

1.2. Klorofüll a ja feofütiin a fotosüsteem II-s

Kogu meie planeedi biomass on pärit fotosünteesist taimedes ja mikroorganismides. Suurem osa maapealsest fotosünteesist sõltub kõrgemate taimede võimest lõhustada vett ja kasutada seda prootonite ja elektronide allikana. Vee lõhustamise kõrvalsaaduseks on molekulaarne hapnik ja see protsess on peaaegu kogu atmosfääris oleva hapniku allikaks. Vee lõhustamine oksügeenses fotosünteesis toimub mitmekomponendilises proteiinide kogumikus, mida nimetatakse fotosüsteem II-ks (PSII). Fotosüsteem II muundab päikeseenergiat elektrokeemiliseks potentsiaaliks, mis leiab kasutust ATP tootmisel. Samuti on see elektronide allikaks fotosüsteem I-le, mis toodab redutseerivaid agente süsiniku salvestamiseks süsivesinikena. [3]

Klorofüll a (Chl a) täidab PSII-s kahte peamist ülesannet. Suurem osa fotosüsteemi klorofüllimolekulidest tegelevad valguse neelamisega ja saadud energia ülekandmisega reaktsioonitsentris paiknevale spetsiaalsele klorofüllide paarile. Viimane protsess toimub resonantse energiaülekande meetodil. Reaktsioonitsentri klorofüllü ülesandeks on eraldada laengud teistelt klorofüllidelt saadud energia varal. Tegu on spetsiifilise redoksreaktsiooniga, kus klorofüll annab elektrontransportahelale ära elektroni. Laetud reaktsioonitsentri klorofüll (PSII-s tähistatakse see $P680^+$) redutseeritakse seejärel tagasi esialgsesse seisundisse. Selleks vajalik elektron saadakse eelnevalt mainitud vee lõhustamise protsessist. Reaktsioonitsentri klorofüllipigmentide poolt tekitatud elektronide suunatud liikumist kasutatakse H^+ prootonite viimiseks läbi tülakoidi membraani, mis omakorda tekitab ATP tootmiseks vajaliku elektrokeemilise potentsiaali. [4]

Kuni 1970-ndate lõpuni oli suurem osa teadlastest veendunud, et feofütiin on lihtsalt klorofüllü laguprodukt ja seda peeti väheoluliseks molekuliks. 1970-ndate lõpus viisid aga teadlased V.

Klimov ja V. Karapetjan läbi rea eksperimente, mille tulemused läksid vastuollu varem levinud arvamusega, et esimene elektronretseptor fotosüsteem II-s on erilist tüüpi plastokinoon. Nimelt selgus, et esimese elektronretseptori rolli täidab feofütiin a, mis vahendab elektrone fotosüsteem II esimese elektrondonori kompleksi P680 ja plastokinooni vahel. Laengute eraldumisel annab Chl a elektroni mõne pikosekundi jooksul feofütiinile, mis selle tõttu muutub negatiivse laenguga radikaaliks. Negatiivselt laetud Pheo a radikaal annab elektroni edasi plastokinoonile, misjärel elektron liigub peagi läbi tsütokroomi ja väljub fotosüsteem II-st. Seega on feofütiin a roll enamlevinud fotosünteesisüsteemides väga oluline. [5]

1.3. Selektiivne spektroskoopia

1.3.1. Homogeenne ja mittehomogeenne laienemine

Amorfsetes ainetes paiknevate pigmentide, näiteks fotosünteesilistest pigmentidest ja proteiinidest koosnevate komplekside neeldumis- ja kiirgusspektrite uurimisel on peamiseks probleemiks spektrijoonte mittehomogeenne ja homogeenne laienemine, mis ei kao täielikult ka madalatel temperatuuridel. Selektiivse spektroskoopia meetodid, näiteks spektraalsälgamine ja selektiivselt ergastatud ehk joonkitsendatud fluorestsentsi meetod, võimaldavad uurida huvipakkuvat spektrit oluliselt parema spektraalse lahutusega.

Homogeenne on selline spektrijoonte laienemise mehhanism, mis mõjutab kõigi ansambli olevate molekulide optilisi energiasirdeid samal viisil. Puhtelektroonse optilise siirde homogeenne laius on määratud ergastatud seisundi eluajaga ja algoleku faasist väljaviimise ehk defaseerumise ajaga (*pure dephasing time*, ing. kl.). Homogeenselt laienenud joone, s.t spektririba laiust loetakse loomulikuks laiuseks ja seda kirjeldab Cauchy-Lorentzi jaotus. 0-0 joonel, s.t spektriosal, millele vastava elektronüleminekuga ei kaasne muutust foononite ja molekulisestele võnkumistele vastavate kvantide arvus, on kindel homogeenne laius γ , mille määrab summaarse defaseerumisaja kestvus T_2 :

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{2T_1} + \frac{1}{T_2'}, \quad (1)$$

kus T_1 tähistab ergastatud seisundi eluiga ja T_2' algoleku faasist väljaviimise aega. Homogeenne laius cm^{-1} ühikutes on väljendatav seosega

$$\gamma = (\pi T_2 c)^{-1}, \quad (2)$$

kus c tähistab valguse kiirust ühikutes cm/s ja T_2 defaseerumise aega sekundites. Puhas defaseerumisaeg T_2' sõltub peamiselt molekul-maatriks interaktsioonidest, mis moduleerivad konkreetse elektronülemineku sagedust. 4,5 K juures tehtud mõõtmistel domineerib ergastatud seisundi eluajast tingitud laienemine, kuid algoleku faasist väljaviimise ajast tingitud laienemine sõltub tugevalt temperatuurist ja kõrgematel temperatuuridel on selle roll isegi kordades suurem. Seetõttu saab joonkitsendusmeetodeid kasutada ainult madalatel temperatuuridel. [6]

Mittehomogeense laienemise korral eksisteerib grupi sees (molekulide ansamblis) hulk erinevaid üleminekusagedusi. Mittehomogeenne laienemine on põhjustatud vahetult pigmente ümbritseva nanokeskkonna tingimuste erinevusest. Ümbritseva maatriksi omadused mõjutavad konkreetse molekuli energiaüleminekute sagedusi. Kui pigmendid oleksid ideaalse kristalli sees, mõjuks kõikidele molekulidele ekvivalentsetes võresõlmedes samad tingimused, nii et nende molekulide optilised siirded toimuksid kõik ühesuguse sagedusega ja vastav kiirgus- või neeldumisspekter oleks ainult homogeenselt laienenud. On aga teada, et madaltemperatuursete amorfsete tahkiste, nagu proteiinide, omadused erinevad olulisel määral ideaalsete kristallide omast nende keerulise mikrostruktuuri tõttu. Amorfsetel tahkistel on peaaegu lõpmatu arv potentsiaalseid energiamiinime, mis vastavad erinevatele keemiliselt ekvivalentsetele maatriksi vormidele. [7]

Kirjeldades amorfse proteiinimaatriksiga seotud pigmendi spektraalseid omadusi madalate temperatuuride juures, tuleb lisaks mittehomogeensele spektri laienemisele arvestada ka seda, et iga pigmendi elektronsiire on seotud vastava mittelokaalse maatriksvibratsiooniga (foononiga). Teoreetilisel kirjeldamisel lähtutakse eeldusest, et eksperimentaalselt mõõdetav mittehomogeenne spekter on seotud sellega vastavuses oleva joonkitsendatud spektriga.

Üleminekusageduste lai jaotus klaasilistes maatriksites on fenomenoloogiliselt kirjeldatav mittehomogeense jaotusfunktsiooniga (*inhomogeneous distribution function*, ing. kl.) ehk IDF-ga. IDF-i laius seab piiri tavaliste (mitteselektiivsete) spektroskoopiliste meetodite lahutusvõimele. [8]

1.3.2. Spektraalsälgamine ja selektiivselt ergastatud fluorestsents

Spektraalsälgamise meetod põhineb uuritava objekti molekulide üleminekuenergia muutmisel valguskvantidega ergastamise toimet. Monokromaatse valguse neeldumisel tekib aine mittehomogeenselt laienenud spektrisse täpselt ergastussagedusele vastav kitsas sälg.

Spektraalsälgamist kirjeldasid esimestena peaaegu samaaegselt Gorokhovski [9] Tartus ja Kharlamov [10] Moskvas. Selle meetodi peamine eelis ilmneb resonantsete elektronsiirete uurimisel, võimaldades vastavaid spektrijooni väga kõrge resolutsiooniga eristada. [11]

Spektraalsälgamine toimub läbi erinevate mehhanismide. Neid eristatakse peamiselt selle järgi, kui kaua muutus neeldumises püsib ja kuidas muutus tekitatakse. Sälg on lühiajaline, kui muutus neeldumises on vaadeldav ainult sälgu põletamise ajal. Sälg on püsiv, kui see on vaadeldav pikema aja jooksul peale sälgu põletamist. Mehhanismid jaotatakse üldiselt fotokeemilisteks, mittefotokeemilisteks ja populatsiooni nõelasilma (*population bottleneck*, ing. kl.) spektraalsälgamisteks. Neist esimesed kaks tekitavad püsivaid, viimane aga lühiajalisi särke. Spektraalsälgamine on fotokeemiline, kui sätku põletav laserivalgus tekitab pigmendi ergastatud seisundis keemilise reaktsiooni ja saadud fotoprodukt neelab oluliselt (s. t väljaspool algset neeldumisriba) erineva sagedusega valgust, kui esialgne pigment. Mittefotokeemiline spektraalsälgamine tekitab muutuseid fotokeemiliselt stabiilset pigmenti ümbritseva amorfse tahkise struktuuris. Mittefotokeemilise spektraalsälgamise käigus modifitseeritakse laserivalguse toimet molekuli ja seda ümbritseva maatriksi interaktsiooni nii, et selle molekuli siirdesagedus nihkub eemale ergastava laseri sagedusest, kuid jääb mittehomogeense neeldumisriba sisse [12]. Just fotoproduktide paiknemine molekuli algse spektri suhtes annab esmast teavet spektraalsälgamise mehhanismi kohta. Populatsiooni nõelasilma spektraalsälgamise korral väheneb algseisundi asustatus, sest ergastatud seisund on

seotud kolmanda, metastabiilse seisundiga, mille eluiga jääb tavaliselt millisekundite suurusjärku. Tüüpiline ergastatud oleku eluiga klorofüllilaadsetes molekulides on suurusjärgus 1-10 nanosekundit. [13], [14]

Selektiivselt ergastatud fluorestsentsi ehk FLN (*fluorescence line-narrowing*, ing. kl.) spektroskoopia meetodi puhul ergastatakse kvaasimonokromaatse laserivalgusega väikest gruppi pigmente, et täpselt jälgida nende võrdlemisi ühesuguste molekulide energiaüleminekutega seotud muutuseid spektris. Saadud homogeenselt lainenud spekter on seostatav spektraalsälgatud spektriga. Seega on spektraalsälgamine ja FLN teineteist täiendavad selektiivse spektroskoopia meetodid, mis võivad põhimõtteliselt anda sama informatsiooni. [11], [15]

Spektraalsälgamise ja selektiivse fluorestsentsi spektroskoopia meetodeid on kasulik kombineerida, mõõtes FLN spektrid enne ja peale sälgamist. Kahe FLN spektri vahe annab Δ FLN spektri, millest on maha lahutunud intensiivne laserijoon ning jälgitav on resonantsele üleminekule vastav foononvaba joon. FLN meetodit on Füüsika instituudis kasutatud näiteks klorofüll a elektron-foonon ja elektron-vibratsiooniliste vastasmõjude parameetrite uurimiseks, s.t molekulisestest interaktsioonide uurimiseks.

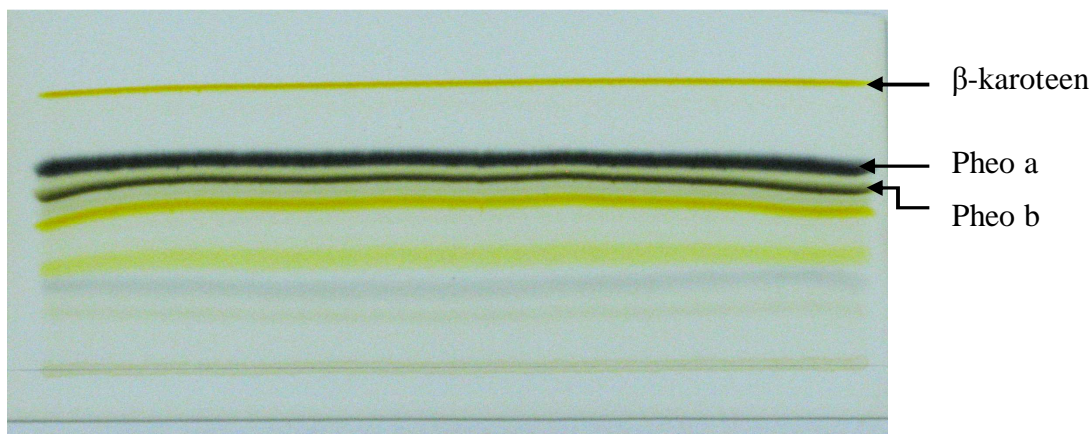
2. Materjalid ja meetodid

2.1. Feofütiin a ekstraheerimine

Feofütiin a valmistati hariliku päevalille (*Helianthus annuus*) roodudeta lehematerjalist. Uhmris lisati lehemassile vedelat lämmastikku ja atsetooni ning purustati lehed ühtlaseks massiks. Seejärel filtreeriti mass Bunseni kolbi kasutades läbi filterpaberi. Klorofüllil feofütiiniks muundamiseks lisati saadud puhastatud segule vesinikkloriidi (0,5 mg 8,2 g roodudeta lehemassi kohta). Segu neutraliseeriti kaltsiumkarbonaadiga kuni reaktsiooni lõppemiseni. Seejärel ekstraheeriti dietüüleetriga taimepigmentid (eeter tekitab segu peale eraldi faasi), kusjuures reaktsiooni tugevdamiseks lisati segusse naatriumkloriidi. Analooligist meetodit klorofüllil muundamisel feofütiiniks on kasutanud ka Eijckelhoff ja Dekker [16] ning Renge koos kaaastöötajatega [17].

Pheo a esialgseks eraldamiseks kasutati taimepigmentide eraldamisel küllaltki levinud meetodit – normaalfaasi õhukese kihi kromatograafiat. Kromatograaferimise leiutas Tartu Ülikooli botaanikaprofessor Mihhail Tswett (1872-1919). See meetod põhineb molekulide erineval afiinsusel, siinsel juhul olid põhiteguriteks molekulide, lahusti ja statsionaarse faasi erinevad suhtelised polaarsused. Normaalfaasi kromatograafia puhul on statsionaarne faas polaarsem kui mobiilne faas. Mobiilses faasis lahustunud molekulid liiguvad üle statsionaarse faasi erineva kiirusega, mis tuleneb nende molekulide suhtelisest erinevast afiinsusest mobiilse ja statsionaarse faasi suhtes. Kuna mobiilne faas on suhteliselt vähepolaarne, on polaarsed molekulid selle suhtes vähem afiinsed kui mittepolaarsed molekulid ja liiguvad viimastest aeglasemalt. Õhukese kihi kromatograafias kasutatakse polaarse kihiga kaetud paberit või klaasi, mis otsapidi peaaegu vertikaalselt mobiilse faasi segusse asetatakse ja sobivate komponentide eraldumisel eluendist eemaldatakse. [18]

Eluendid kromatograaferimiseks leiti katse-eksituse meetodil. Kromatograaferimiseks kanti etanooli-pigmentisegu kapillaariga Mercki Silica geeliga plaadile. Esialgu jooksutati plaati heksaani ja atsetooni segus (vahekorras 5:3). Tulemus on näha järgneval fotol (joonis 3).



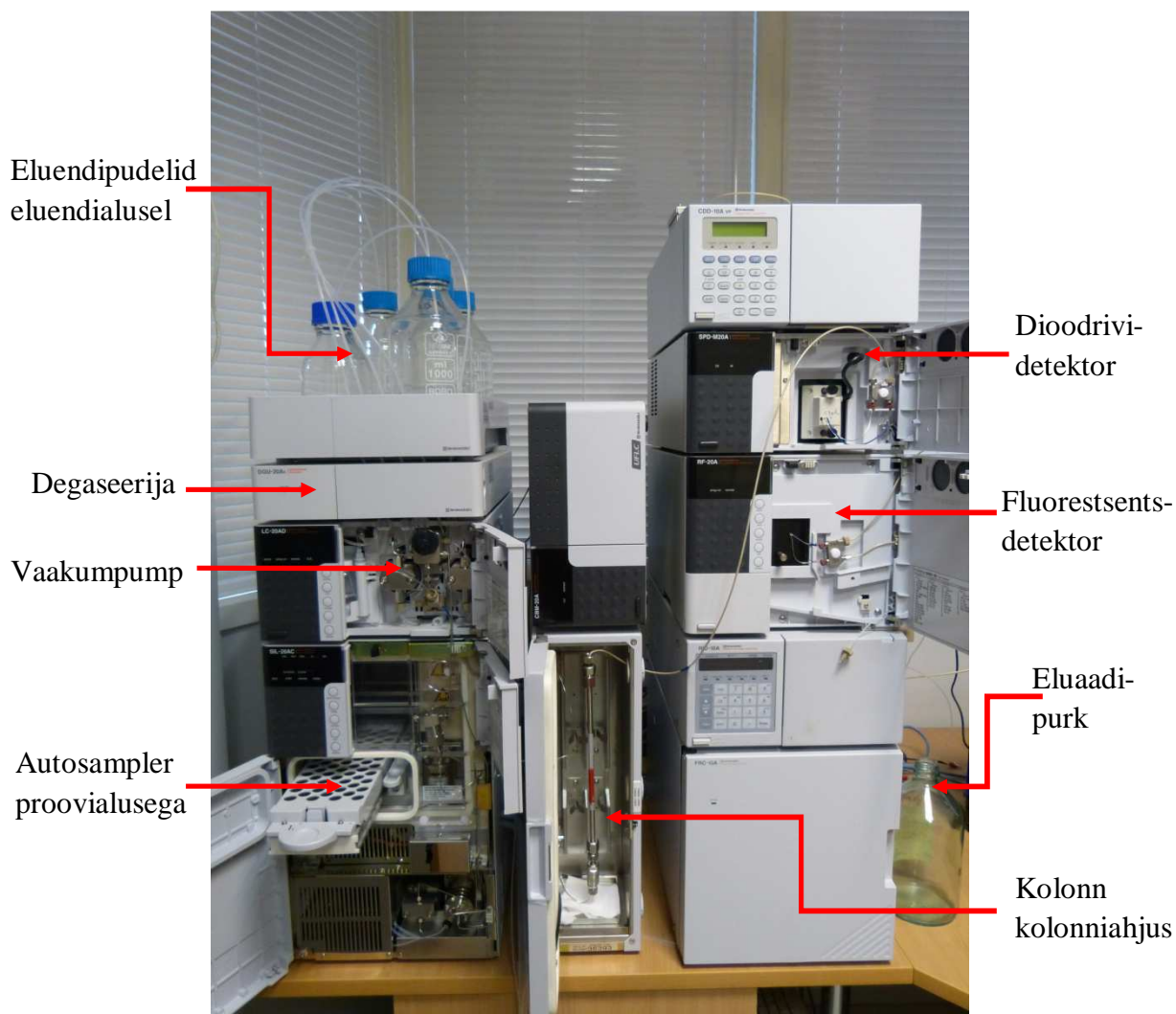
Joonis 3. Õhukese plaadi kromatograafia feofütiin a ja feofütiin b-ga.

Seejärel eemaldati plaadilt spaatliga ettevaatlikult feofütiin a, kraapides maha ainult feofütiin a-d sisaldav joon. Saadud puru lahustati etanoolis (parema lahustumise saavutamiseks kasutati vibroregistrit) ning Silica geel sadestati põhja Eppendorf Centrifuge 5804R tsentrifuugiga. Eetri keemise vältimiseks jahutati tsentrifuug 4 °C kraadini; tsentrifuugiti 14 000 pöörde juures mõned minutid. Lisapuhastuseks kanti pipetiga eraldatud segu uuele Mercki plaadile, mida jooksutati heksaanis ja etüülatsetaadis (vahekord 7:3). See eraldas feofütiin a selle muundunud vormist, mis on polarsem kui feofütiin a, s.t liikus Silica geeli plaadil aeglasemalt. Seejärel eemaldati plaadilt uuesti feofütiin a, mis pärast etanoolis lahustamist tsentrifuugiti. Järgnevalt eemaldati väga ettevaatlikult pipetiga etanooli-feofütiini segu, vältides silikapuru kaasavõtmist.

Edasi puhastati segu HPLC-ga (*high performance liquid chromatographer*, ing. kl.) ehk kõrgsurve vedelikukromatograafiaga. HPLC tööpõhimõte on sarnane õhukese kihi kromatograafiaga, kuid siin on tegu pööratud faasi kromatograafiaga – kitsas kolonnis paiknev statsionaarne faas on vähem polaarne kui sellest läbi pumbatav eluent. Seega liiguvad siin kiiremini just polarsemad ühendid.

Tööks kasutati HPLC 20A Prominence (Shimadzu) kromatograferimise süsteemi, millest olid kasutusel sama firma LC-20AD kahekolviline pump, DGU-20 A5 membraan-vaakumdegaseerija, SIL-20AC jahutusega autosampler (robotpipett proovialusega), CTO-

10ASvp kolonniahj, SPD-10M20A diodrividetektor ja RF-20A fluorestsentsdetektor (joonis 4).

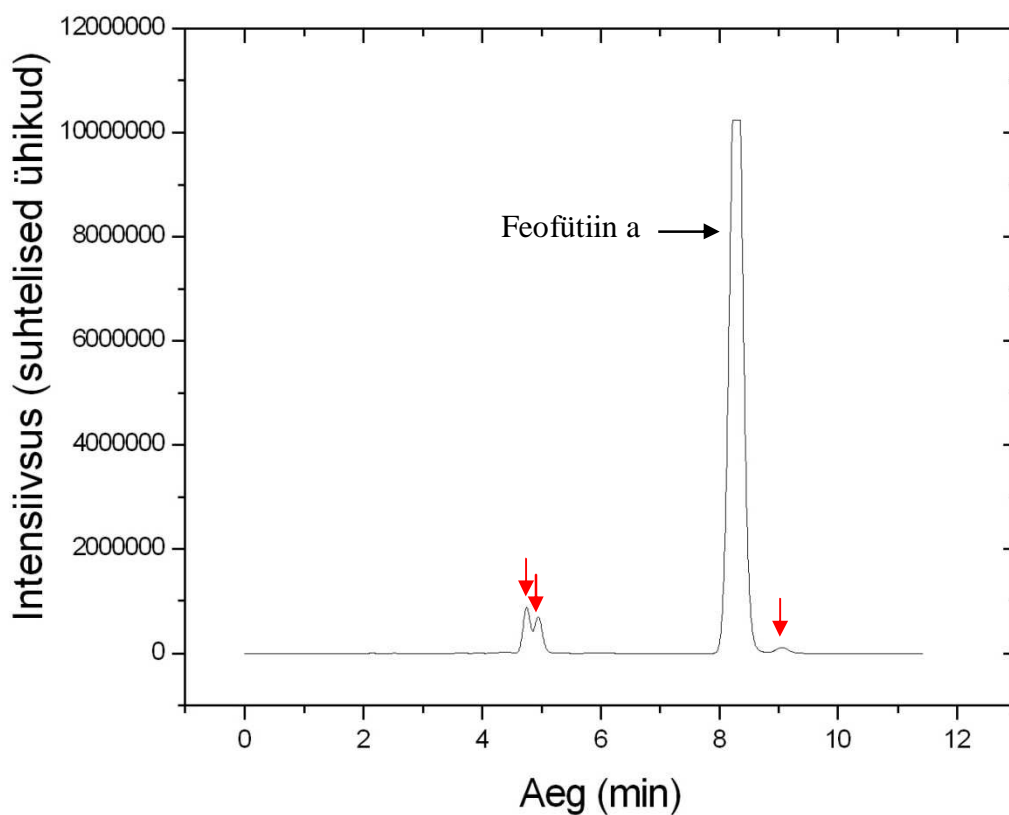


Joonis 4. Kõrgsurve vedelikukromatograaf.

Jooksutamiseks kasutati metanooli ja etüülatsetaati vahekorras 4:1. Feofütiin a puhastati välja Luna C18(2) 150x10 mm kolonniga, analüütilisteks mõõtmisteks kasutati Luna C18(2) 150x4,6 mm kolonni. Puhastamisel töötas pump kiirusega 6 ml/min, analüütilistel mõõtmistel 2 ml/min; kolonniahj oli seatud 30 °C juurde. Feofütiin a eraldati käsitsi, eemaldades väljavoolutoru eluaadipurgist, sest analüütilise kromatograafia ei osutunud protsessi automatiseerimine praktiliseks. Feofütiin a väljus ligikaudu 14. ja 17. minuti vahel, seda jälgiti vahetult juhtarvuti ekraanilt. Saadud segu kallati Petri tassile ja kuivatati eksikaatoris, s.t vaakumi all, kusjuures kuivatamise lõppjärgus tõsteti segu pipetiga hoiutopsi. Soojendamine

suurendas katsete käigus soovimatute ühendite osakaalu, mistõttu seda kuivatamise kiirendamiseks ei kasutatud. Lõppkokkuvõttes saadi küllaltki puhas feofütiin a (joonis 5).

Erinevad HPLC mõõtmised näitasid lisaks kuumutamisele ka näiteks atsetooni ja happe halba mõju feofütiini stabiilsusele, s.t atsetoonis tekkis juurde soovimatuid feofütiini derivaate. Seega võib eeldada, et kirjeldatud meetodi abil saadi puhtam feofütiin kui varem kasutusel olnud meetodite puhul, kus HPLC-ga materjali ei puhastatud.

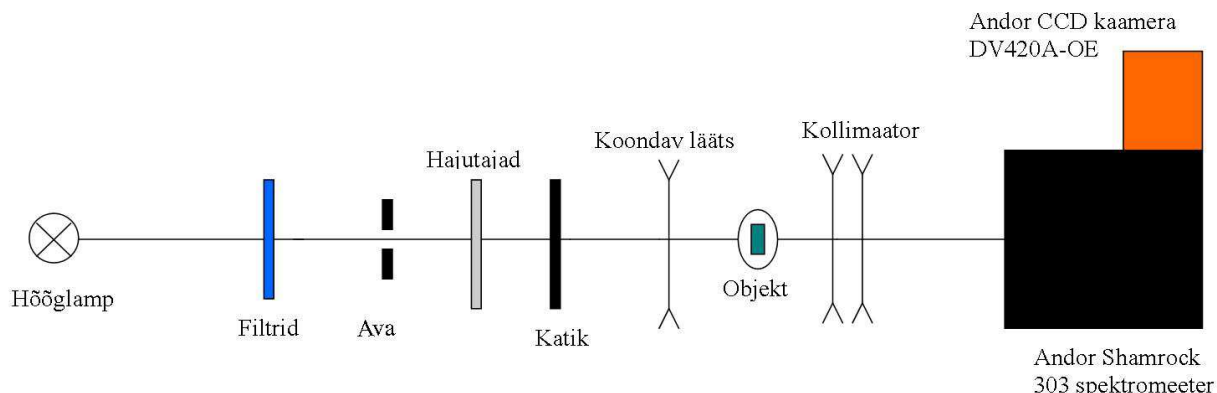


Joonis 5. Puhastatud ja kuivatatud feofütiin a intensiivsus kontrollmõõtmisel mitteidentifitseeritud lisaainete (tähistatud punaste nooltega) suhtes.

2.2. Kasutatud mõõtesüsteemid

Feofütiin a lahustati mõõtmiste sooritamiseks trietüülamiinis (TEA). Toatemperatuuril mõõdeti neeldumis- ja kiirgusspekter kvartsküveti asetatud lahusest. Heeliumi krüostaadis pandi lahus väikesesse želatiinküveti, lämmastiku krüostaadis oli kasutusel kandiline erineva

optilise teepikkusega plastmassküvett - küveti üks horisontaalne telg oli lühem kui teine, vastavalt 5 mm ja 10 mm.

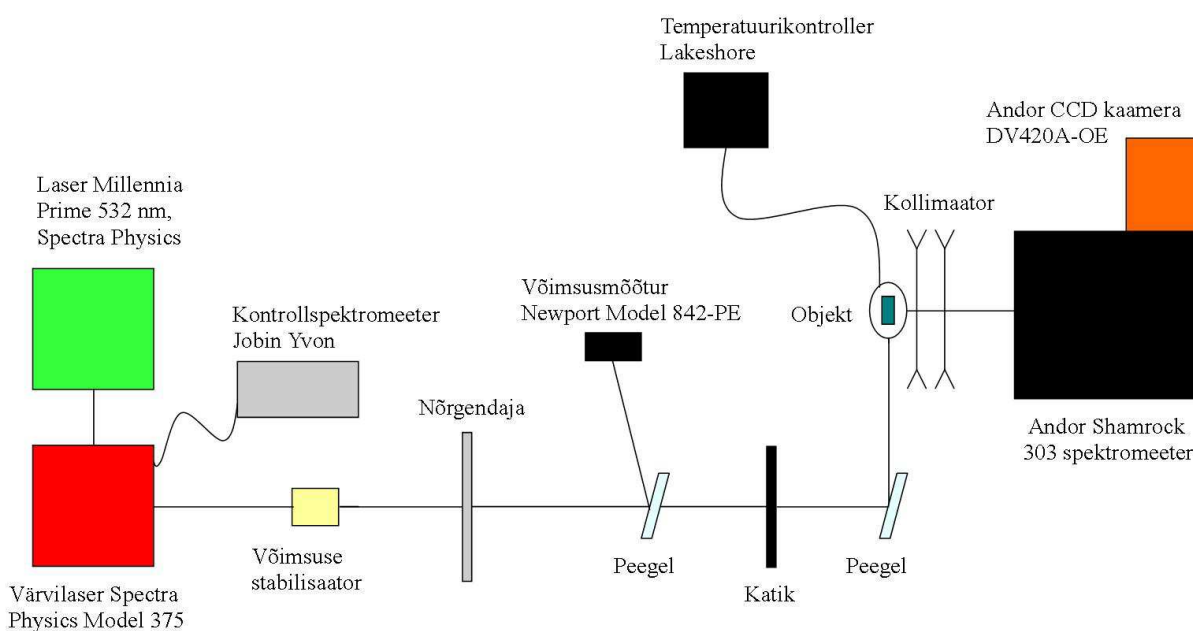


Joonis 6. Neeldumise mõõtmise katseskeem.

Neeldumise mõõtmiseks (joonis 6) valgustati katseobjekti stabiliseeritud BPS100 (BWTEK) valge volframlambiga, mille spektri intensiivsust modifitseeriti vene päritolu LOMO filtritega C3C-7, CC-2, C3C-16 ja HC-7. Filtritega tagati ühtlane valgus mõõdetavas neeldumispirkonnas. Kiirt kitsendati ava abil, lisaks kasutati hajutajaid üldise intensiivsuse vähendamiseks. Kiir juhiti koondava lääts abil objektile, mis oli vastavalt katsele kas suletud küvetis (toatemperatuuril mõõtes) või krüostaadis (madaltemperatuursete mõõtmiste sooritamiseks). Kollimaatori, siinsel juhul koondavate läätsede kaksiksüsteemi abil, juhiti kiir Andor Shamrock 303 spektromeetrisse. Valgust detekteeriti elektriliselt jahutatava CCD kaameraga DV420A-OE (Andor Technology). Sama katseskeemi kasutati ka spektraalsälgamisel. Laserikiir suunati objektile optilise telje suhtes 90° nurga all (vt joonis 7). Spektrisse sälgatud auke, s.t muutusi proovi neeldumisspektris, detekteeriti valge valgusega.

Kiirgust mõõdeti kahel viisil. Mitteselektiivse spektri mõõtmisel ergastati objekti väikese dioodlaseriga (410 nm). Sel juhul oli objekt vastavalt vajadusele krüostaadis, millega oli ühendatud temperatuurikontroller, või küvetis (toatemperatuuril). Laserijoon eemaldati mõõdetavast spektrist spektroskoobi ette asetatud LOMO KC-13 punase filtriga. Laserijoonega kaasnev kiirgus punases spektrialas eemaldati C3C-7 filtri abil. Kõik kiirgusspektrid on korregeeritud vastavalt mõõtmissüsteemi tundlikkusele.

Selektiivsete mõõtmiste korral (joonis 7) kasutati pumpavat Millennia Prime 532 nm laserit ja muudetava lainepikkusega Model 375 värvilaserit (mõlemad Spectra Physics). Valguskiire lainepikkust kontrolliti Jobin Yvon spektromeetri abil (1 piksel = 0,007 nm). Värvilaserist väljuv kiir juhiti võimsuse stabilisaatorisse, sealt edasi hallile gradientsele filtrile, mis toimis nõrgendajana. Enne katikut kontrolliti laseri võimsust Newport Model 842-PE mõõturiga. Objekt asus krüostaadis, mille külge oli ühendatud Lakeshore'i temperatuurikontroller, et mõõta ja muuta objekti temperatuuri. Fluorestsents koondati ergastava kiire suhtes 90° nurga all asunud kollimaatoriga spektromeetrile, millega oli ühendatud CCD kaamera.



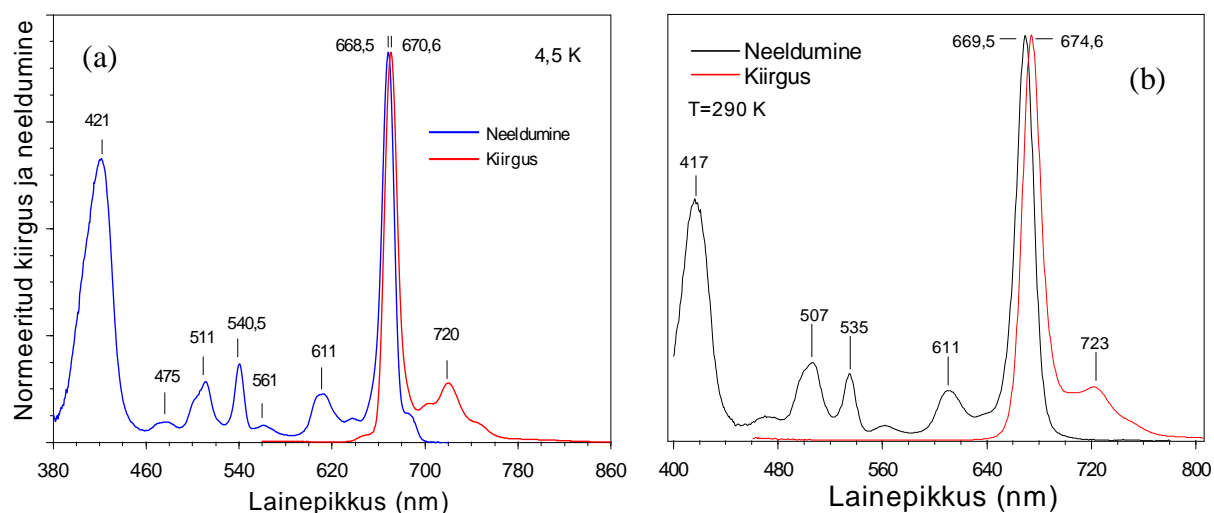
Joonis 7. Selektiivspektroskoopilise kiirguse mõõtmise katseskeem.

Mõõtmistel kasutati spektromeetris erinevaid difraktsioonivõresid – võresid 1800, 600 ja 150 joonega millimeetri kohta, mille vastavad lahutusvõimed on 0,03; 0,13 ja 0,57 nm ühe piksli kohta. Kõige tihedamale võrele vastab mõõtmisvahemik 32 nm, 600 joont millimeetris võimaldab spektrit mõõta 129 nm ulatuses ja kõige hõredam võre 560 nm-s vahemikus.

3. Tulemused ja arutelu

3.1. Feofütiin a neeldumis- ja kiirgusspektrid ning nende peegelsümmeetria

Joonisel 8b kujutab trietüülamiinis lahustatud Pheo a neeldumis- ja kiirgusspektrit toatemperatuuril. Kiirgusspektri peamaksimum on 674,6 nm juures, millega kaasneb võnkeriba maksimumiga 723 nm. Võrdlemisi väike Stokesi nihe (~5 nm) kiirguse ja neeldumise vahel viitab, et kiirgamine toimub madalaimalt ergastustasemelt pärast vibroonset relaksatsiooni. Maksimumide sarnane kuju ja laius näitavad proovi piisavat puhtust mõõtmiste sooritamiseks.



Joonis 8. Trietüülamiinis lahustatud Pheo a neeldumis- ja kiirgusspekter 4,5 K juures (a) ja toatemperatuuril (b). Arvud tähistavad maksimumide asukohti nanomeetrites.

Neeldumisspekter on seevastu mitmekesisem. Tuginedes Goutermani nelja orbitaali mudelile, vastab toatemperatuuril 669,5 nm madalaimale energiaüleminekule (Q_y riba) ja 611 nm juures asub sellega kaasneva võnkeülemineku neeldumine. Energeetiliselt järgmise astme üleminekule vastab 535 nm riba (Q_x), 507 nm juures on sellele üleminekule vastav võnkeriba. 417 nm maksimum vastab summaarsele kõrgemat järku energiaüleminekutele ja seda nimetatakse Soret' ribaks. Teiste nähtavate maksimumide päritolu ei ole veel üheselt määratud, kuid võib spekuloida, et 561 nm ja 475 nm juures on vastavalt Q_y -i ja Q_x -i teist

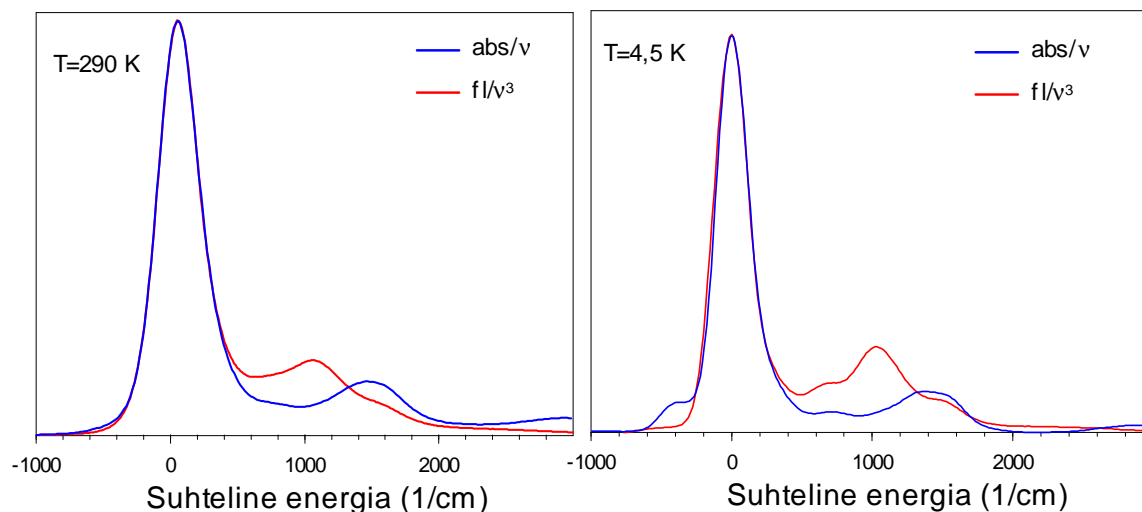
järku võnkeribad. Joonis 8a näitab neeldumis- ja kiirgusspektrit madalal temperatuuril. Need on mõnevõrra struktureeritumad toatemperatuuriga võrreldes.

Kirjanduses on arutletud, et Goutermani mudel ei ole feofütiin a spektri kirjeldamiseks õige. Nimelt pakkusid Fragata *et al.* välja, et kõik kuus Q piirkonna energiaüleminekut on reaalsed elektronüleminekud [19]. Dage Sundholmi teoreetilised tihedusfunktsioonil põhinevad arvutused toetavad seda teooriat [2], samas kui Hasegawa ja teiste SAC-CI-le põhinevad arvutused leidsid Q piirkonnast ainult kaks elektroonset üleminekut, seega kinnitades Goutermani nelja orbitaali mudelit [20].

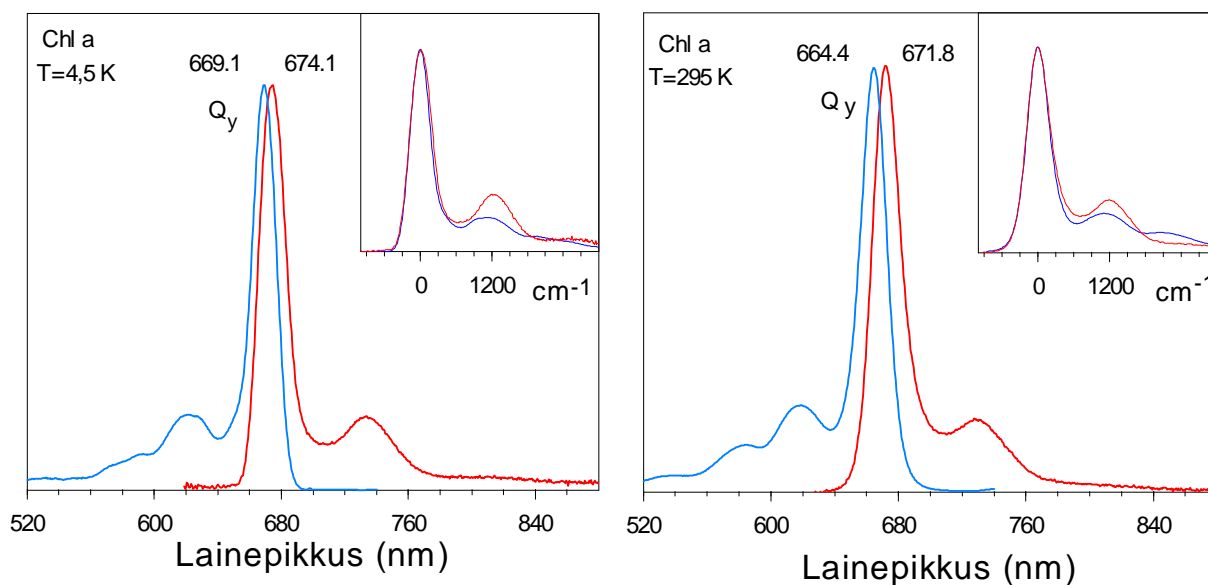
Pegelsümmeetria hindamiseks on neeldumise Q_y riba ja kiirguse spekter toatemperatuuril ning 4,5 K juures esitatud joonisel 9. Kiirgusspektrit on seoses energiaskaalasse üleminekuga parandatud sageduse ruutkõveraga (ν^2). Lisaks on neeldumisspekter läbi jagatud sageduse esimese astmega ja kiirgus sageduse kolmanda astmega, s.t spektrid on toodud ülemineku dipoolmomendi esituses [21]. Hästi on näha peamaksimumide peaaegu täielik kattuvus, kuid võnkeribades esineb suuri erinevusi. Franck-Condoni printsiip ennustab aga kiirgus- ja neeldumisspektri üleminekute pegelsümmeetriat, seega tuleks edaspidi uurida, mis põhjustab feofütiin a-s kõrvalekaldeid sellest printsiibist. Üheks põhjuseks võib kindlasti pidada põhiseisundi ja ergastatud seisundi võnkumiste erinevust, kuid need ei seleta täielikult pegelsümmeetria puudumist. Toatemperatuurse mõõtmise juures on näha ka neeldumise suuremat intensiivsust 2000 cm^{-1} juures, kuid seda võib lugeda hajumisest tingitud mõõtmisveaks. Madaltemperatuurisel mõõtmisel tulevad välja uued struktuurid, kuid -515 cm^{-1} juures nähtavat maksimumi kiirgusspektris võib pidada lisandite mõjuks. Lisand võib olla ka Pheo a tautomeer, vt spektraalsälgamist peatükist 3.4.

Võrdlemise eesmärgil on välja toodud ka 2-propanoolis lahustatud klorofüll a neeldumis- ja kiirgusspektrid toatemperatuuril ja 4,5 K juures (joonis 10). Pegelsümmeetria on rikutud ka klorofüll a puhul. Klorofüllil seisneb rikutus aga peamiselt võnkeribade intensiivsuste erinevuses (neeldumisel on see väiksem kui kiirgusel), samas kui feofütiini võnkeriba asub neeldumis- ja kiirgusspektris peamaksimumist erineval kaugusel. Feofütiini põhiseisundi võnkumisi uuritakse üksikasjalikumalt peatükis 3.3. selektiivse fluorestsentsi meetodiga.

Võrreldes feofütiini ja klorofüllil on näha, et klorofüllil neeldumisspektris asuvad Q_x ja Q_y ribad üksteisele palju lähemal kui feofütiini neeldumisspektris. Klorofüllil neeldumisspektris hõlmab kogu Q neeldumine piirkonna 520 – 690 nm. Seevastu feofütiinis on Q_y ja Q_x ribad üksteisest võrdlemisi kaugel ja selgelt eristatavad, hõlmates spektriala 460 – 680 nm.



Joonis 9. Feofütiin a fluorestsentsi (fl) ja neeldumise (abs) pööratud spektrid toatemperatuuril ja 4,5 K juures.



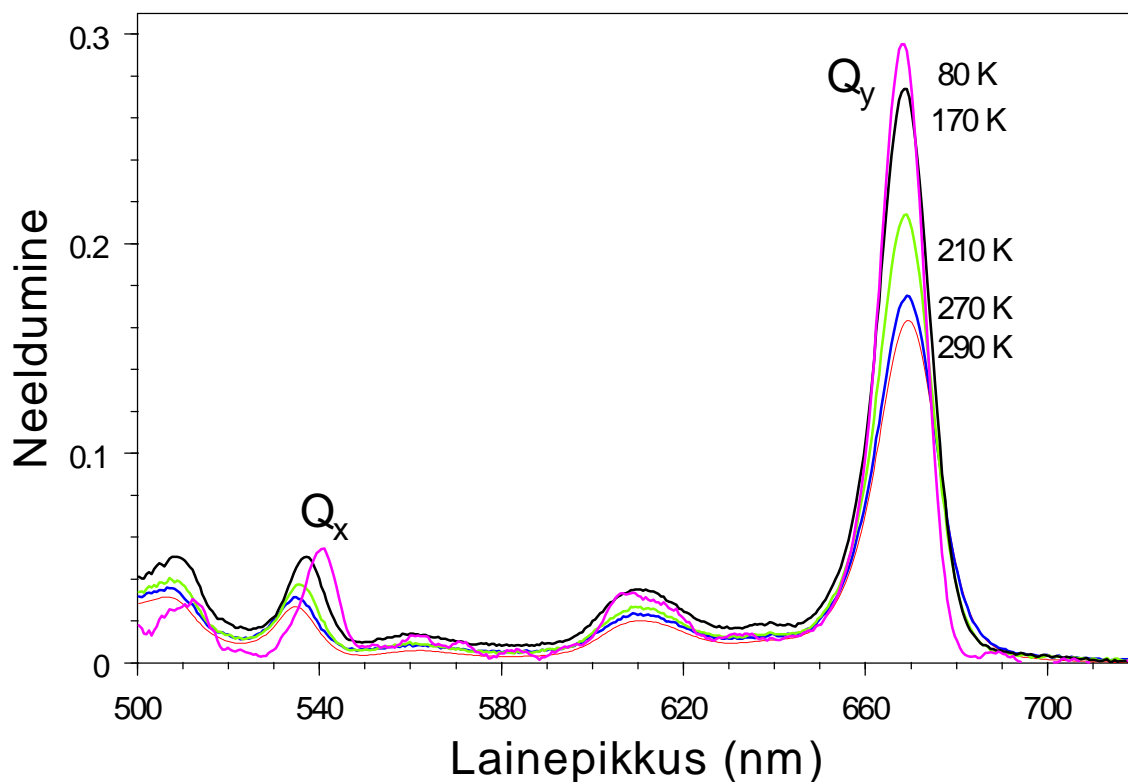
Joonis 10. Klorofüll a fluorestsentsi ja neeldumise spektrid toatemperatuuril ja 4,5 K juures 2-propanoolis. Üleval paremas nurgas kiirguse ja neeldumise pööratud spekter. Punane joon tähistab kiirgust, sinine neeldumist. Joonised on võetud tööst [15].

3.2. Neeldumis- ja kiirgusspektri temperatuurisõltuvus

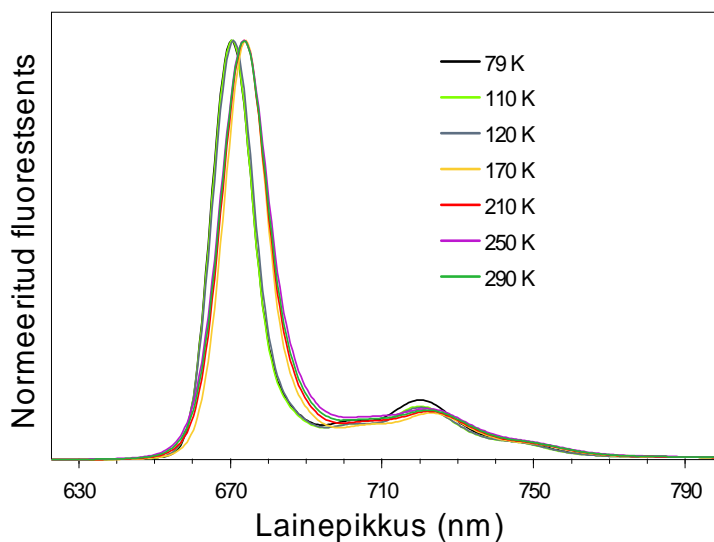
Trietüülamiinis lahustatud feofütiin a spektreid mõõdeti erinevatel temperatuuridel. Esialgsed mõõtmised heeliumi krüostaadiga näitasid, et 80 K ja 4,5 K vahel ei toimu enam olulisi muutuseid. Seega mõõdeti spektrit lämmastiku krüostaadis, kus sai kasutada erineva optilise teepikkusega küveti. Kiirguse ja neeldumise mõõtmisel on objekti optimaalsed optilised tihedused erinevad, seega valiti kiirguse mõõtmisel väiksem, 5 mm optilise teepikkusega telg ja neeldumise mõõtmiseks 10 mm teepikkusega telg. Kiirgust ja neeldumist tuli mõõta samalt objektilt, sest amorfsed tahkised võivad moodustada jahutamisel mõnevõrra erinevaid matrikseid. Seega võivad neeldumises ja kiirgumises erinevaid objekte kasutades matriksi muutused tulemusi mõjutada.

Joonis 11 kujutab feofütiin a neeldumisspektreid erinevatel temperatuuridel. Temperatuuri alandamisega kaasnes neeldumise intensiivistumine, mis on seotud neeldumisriba kitsenemise ja lahuse ruumala vähenemisega (kontsentratsiooni kasvuga). Q_y ribaga toimus temperatuuri vähendamisel ühtlane sininihe, kokku $\sim 22\text{ cm}^{-1}$, mis on kooskõlas I. Renge sooritatud mõõtmistega [17]. Seevastu toimus Q_x ribaga punanihe ($\sim 200\text{ cm}^{-1}$), mis erineb Renge tulemustest, kus Q_x nihkus sinise poole. Seda võib pidada erinevate matriksite kasutamisest tingitud erinevuseks. Energiaüleminekute temperatuurisõltuvus on võrdlemisi tavaline nähtus, sest põhiseisundi adiabaatilise potentsiaali kõver erineb ergastatud seisundi omast.

Võrdluseks olgu toodud töö [15], kus jälgiti temperatuuri alandamisel klorofüllil Q_y riba nihet 28 cm^{-1} võrra spektri sinise otsa poole 1-propanoolis ja 11 cm^{-1} nihet 2-propanoolis. Need lahused erinevad selle poolest, et jahutamisel muutub 1-propanoolis klorofüllil tsentraalne magneesium 6-koordinaatseks. 2-propanoolis on nii toatemperatuuril kui krüogeensel temperatuuril Mg^{2+} 6-koordinaatne. Kuna feofütiinis puudub tsentraalne magneesium, siis suhteliselt suur 22 cm^{-1} -ne Q_y asukoha muutus näitab matriksi olulist mõju lisaks porfüriiniringi keemiliste sidemete arvule.

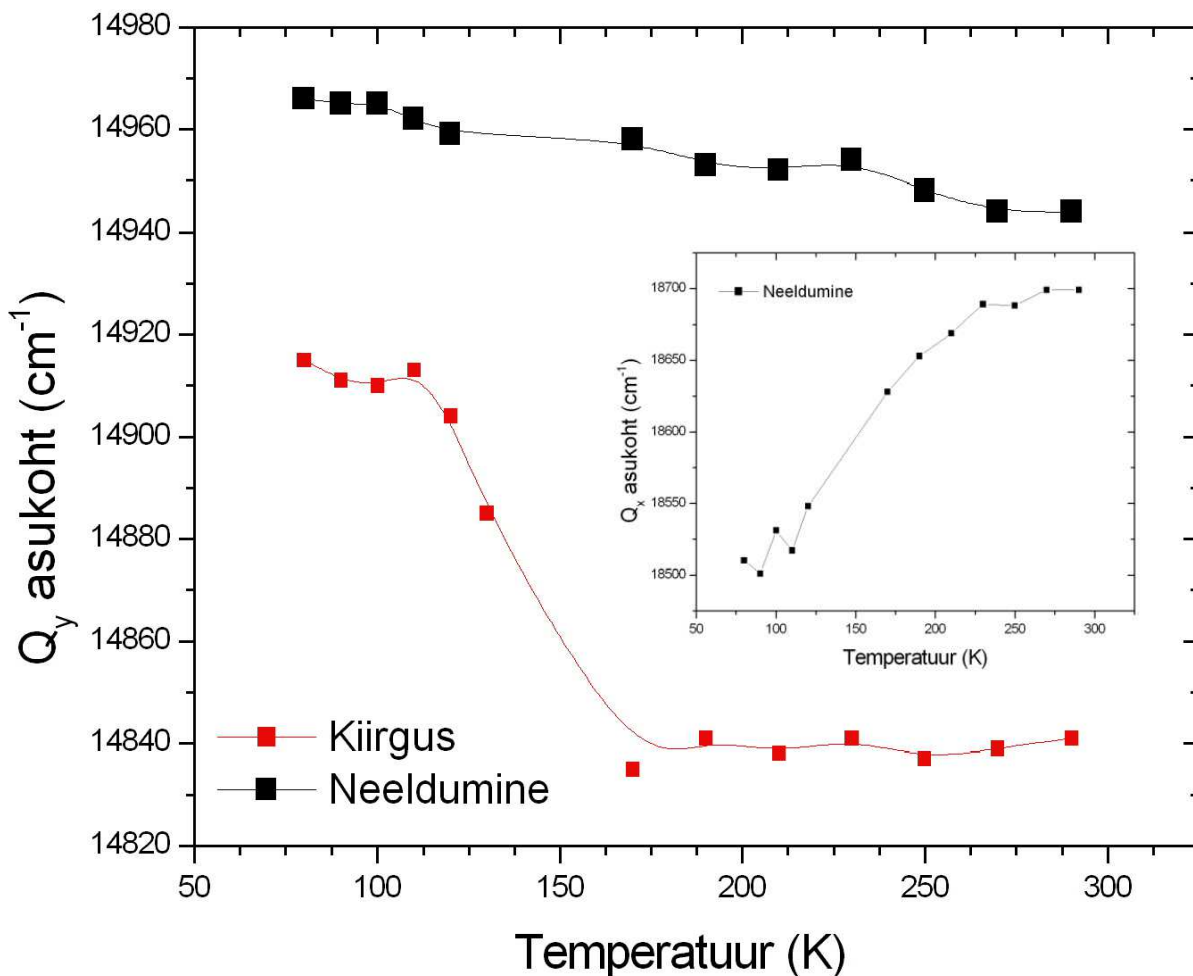


Joonis 11. Pheo a neeldumisspektrid erinevatel temperatuuridel trietüülamiinis. Q_y on temperatuuri vähendamisega nihkunud spektri sinise otsa poole ($\sim 22 \text{ cm}^{-1}$), Q_x punase poole ($\sim 200 \text{ cm}^{-1}$).



Joonis 12. Pheo a kiirgusspektrid erinevatel temperatuuridel trietüülamiinis. Hästi on näha sininihe madalatel temperatuuridel ja peamaksimumi kitsenemine.

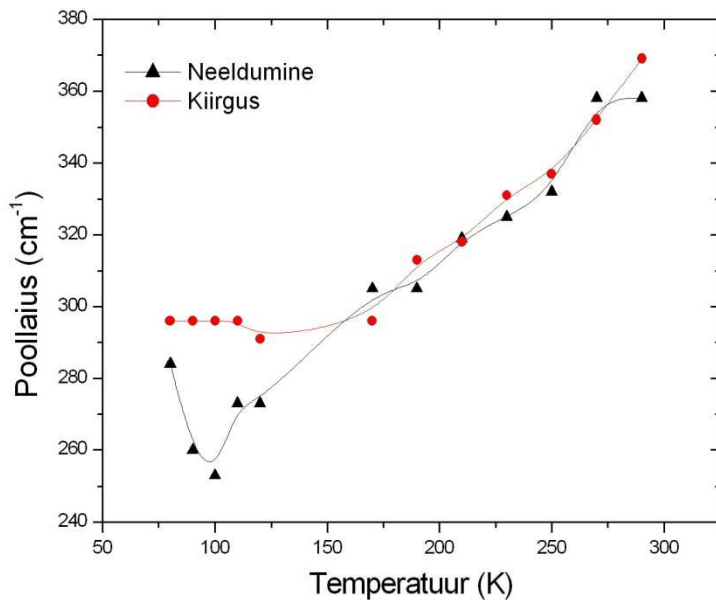
Kiirgusspektrid (joonis 12) on võrdlemise eesmärgil sobitatud peamaksimumi samale suhtelisele intensiivsusele. Peamaksimumil on jälgitav hüppeline sininihe 170 K ja 120 K vahel ($\sim 75 \text{ cm}^{-1}$), mida neeldumisspektris ei esinenud. Joonis 11 näitab kiirguse ja neeldumise peamaksimumide asukoha muutuseid, samuti Q_x -i asukoha muutuseid.



Joonis 13. Kiirguse ja neeldumise peamaksimumide asukohtade temperatuurisõltuvused. Väikeses kastis Q_x -i tipu nihkumise graafiline esitus. Peamaksimumid nihkusid temperatuuri vähendamise suunas lühemate lainepikkuste suunas, kuid Q_x nihkus pikemate lainepikkuste poole.

Orgaaniliste maatriksite soojuspaisumine on palju suurem kui anorgaanilistel, seetõttu on osa temperatuurisõltuvusest tingitud just maatriksi mõjudest. Q_x riba järsk nihe ei vasta aga täielikult solvendi klaasistumisele, mis trietüülamiinil toimub 158,45 K juures - nihe on aeglasem kui klaasistumine.

Samuti mõõdeti peamaksimumide poollaiuseid nii kiirgus- kui neeldumisspektril (joonis 14). Kõrgematelt temperatuuridelt madalamate suunas liikudes kitsenesid mõlema spektri peamaksimumid, kusjuures neeldumisspektri järsku laienemist 80 K juures võib pidada hajumise suurenemisest tingitud mõõtmisveaks.



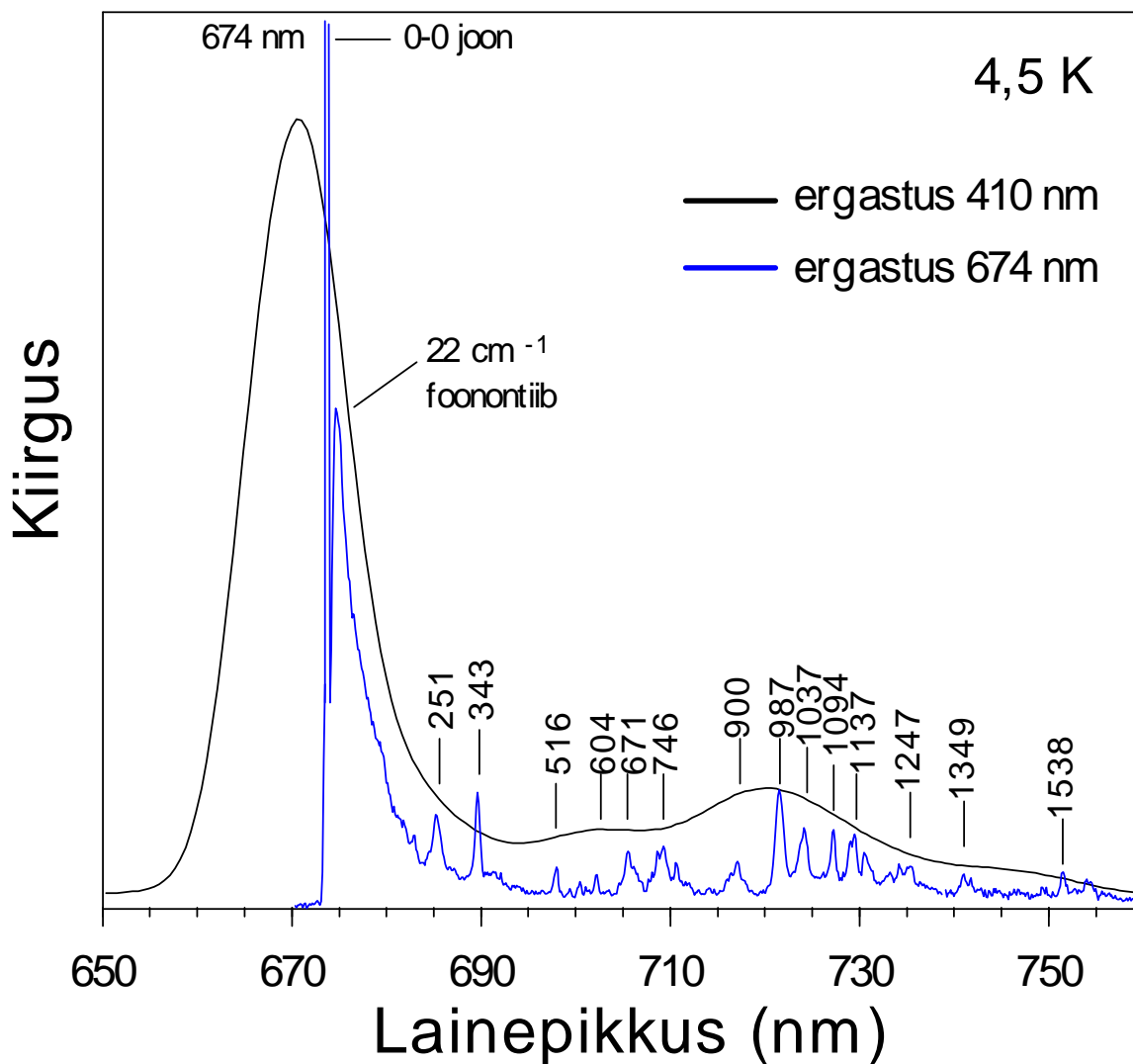
Joonis 14. Kiirgus- ja neeldumisspektri peamaksimumide poollaiuse temperatuurisõltuvus.

on tõenäoliselt põhjustatud maatriksis tekkivatest pingeväljadest. Alternatiivsele seletusele elektron-foonon vastasmõju tugevast muutusest oleks keeruline põhjendust leida.

Kiirguse poollaiuse juures on huvitav selle väiksem temperatuurisõltuvus neeldumisega võrreldes. 100-150 K vahel, kus kiirgusspektri järsk punanihe aset leiab, kiirgusjoone laius ($\sim 300 \text{ cm}^{-1}$) peaaegu ei muutu. Neeldumisriba poollaiuse suurenemine 80 K juures on ilmselt tingitud hajumise suurenemisest teadmata põhjusel. Kiirgusmaksimumi positsiooni järsk muutus 100...160 K vahel

3.3. Selektiivne ergastusspekter

Selektiivspektroskoopilisi meetodeid kasutades uuriti Q_y riba mittehomogeenset laienemist trietüülamiini klaasis. Selleks ergastati ja põletati proovi laseriga 672 nm ja 674 nm juures. Teostati erinevate kiirgusdoosidega kaheksast mõõtmisest koosnev tsükkel. Joonisel 15 on esitatud tavaline madaltemperatuurne kiirgusspekter ja selektiivselt mõõdetud kiirguse tsükli esimese ja kaheksanda mõõtmise vahe (ΔFLN spekter). ΔFLN -i meetodi kasutamise eeliseks on ergastava laseri spektri maha lahutumine lõpptulemusest [22]. Selgelt eristuvad lisaks 0-0 joonele ka foonontiib ja võnkeribad. 0-0 joon vastab tahkises ühele elektronüleminekule. Selle kuju vastab Lorentzi jaotusele. 0-0 joon on tegelikkuses palju kitsam, siin on see laienenud mõõtesüsteemi piiratud lahutusvõime tõttu, mis samuti foononvaba joone intensiivsust vähendab. See aga ei mõjuta edasist analüüsi, sest kasutatakse integraalset, s.t pindalal põhinevat intensiivsust riba tipu intensiivsuse asemel. Foonontiiba iseloomustab lähemalt joonis 16, kus foonontiib on sobitatud Gaussi ja Lorentzi jaotusega. Foonontiib sobitub esimeses lähenduses selle funktsiooniga küllaltki hästi.



Joonis 15. Madaltemperatuurne mitteselektiivne spekter (must joon, ergastus 410 nm) ja selektiivne spekter ehk Δ FLN (sinine joon, ergastus 674 nm). Selektiivne spekter siin kahe erineva doosiga, vastavalt $119,7 \text{ mJ/cm}^2$ ja $3,3 \text{ mJ/cm}^2$, kiiritatud spektri vahe. 0-0 joonest näha 50%. Märkitud valikuliselt tugevamad võnkeribad ja foonontiiva maksimum pöördsentimeetrites.

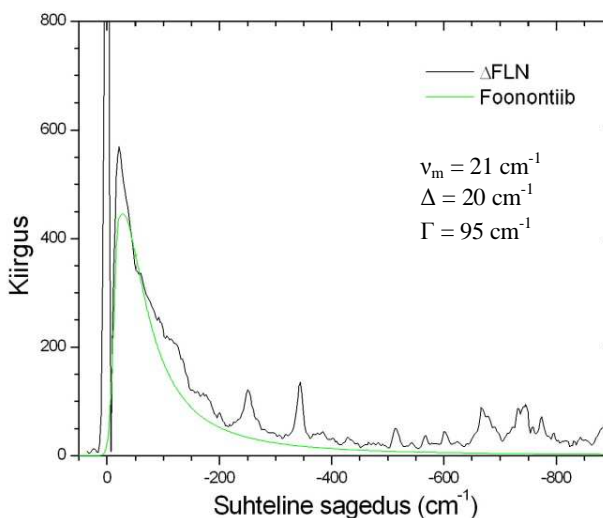
Δ FLN abil uuritakse elektronide ja foononite ning elektronide ja võnkemoodide interaktsiooni, kusjuures foononite all mõeldakse madalsageduslikke mittelokaalseid maatriksite võnkeid ja võnkemoodide all mõistetakse suhteliselt kõrgsageduslikke feofütiini molekuli siseseid võnkeid. Debye-Walleri faktor iseloomustab elektron-foonon vastasmõju tugevust:

$$\alpha = \frac{I_{ZLP}}{I_{ZPL} + I_{PSB}} = e^{-S_{ph}}, \quad (3)$$

kus I_{ZPL} ja I_{PSB} on vastavalt 0-0 joone ja foonontiiva integraalsed intensiivsused. S_{ph} on dimensionitu Huang-Rhys (HR) maatriksi foononite faktor – keskmine arv foononeid, mis vabanevad või neelduvad mitteideaalse molekuli elektronüleminekul [23].

Lisaks tugevusele (s.t Huang-Rhys faktorile) iseloomustab foonontiiba selle kuju. Kuju kirjeldamisel kasutati funktsiooni, mis sagedustel 0 - ν_m on

Gaussi kujuga ja sagedustel üle ν_m -i Lorentzi kujuga, kus ν_m on foonontiiva maksimum. Joonisel 16 esitatud ΔFLN spekter on lähendatud parameetritega ν_m , Δ , Γ , kus Δ on Gaussi funktsiooni poollaius (kogulaius poolel kõrgusel) ja Γ Lorentzi funktsiooni poollaius. Vastavate parameetrite väärtused on näidatud joonisel 16.



Joonis 16. Selektiivne ergastusspekter (ΔFLN) ja Gaussi-Lorenzi jaotusega esitatud foonontiib.

Huang-Rhys faktor kogu võnkeriba tugevuse kohta avaldub järgnevalt:

$$e^{-S_{vib}} = \frac{I_{0-0}}{I_{0-0} + I_{vib}}, \quad (4)$$

kus I_{0-0} tähistab 0-0 joone ja selle foonontiiva summaarset integraalset intensiivsust ja I_{vib} summaarset võnkeribade intensiivsust. Iga üksiku võnkejoone Huang-Rhys faktor avaldub

$$e^{-S_{vib}} = \frac{I_{0-0}}{I_{0-0} + I_j}, \quad (5)$$

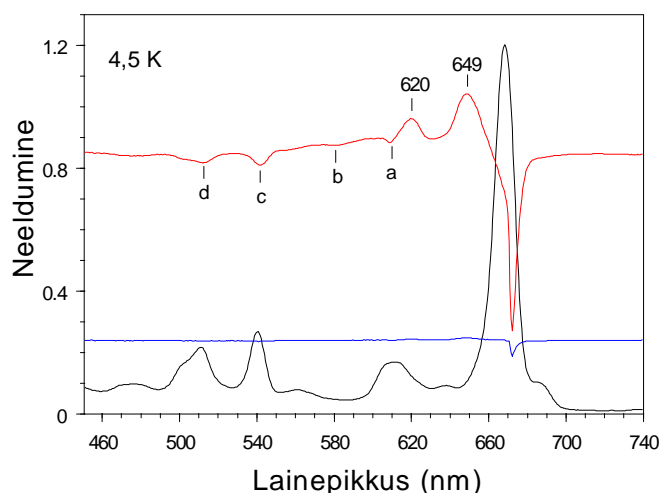
kus I_j on võnkejoone integraalne intensiivsus. HR faktorid arvutati 672 nm juures ergastatud spektrile, kus leiti $S_{ph} = 0,64 \pm 0,08$ ja $S_{vib} = 0,53 \pm 0,06$. Üksikute võnkejoonte HR faktorid on

esitatud lisas (lisa 1), kusjuures asukohad on antud energiaskaalas, kus 0-0 joon on viidud nulli. Asukoha täpsuseks on hinnatud $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$.

Kuna madalal temperatuuril mõõdetud (s.t $k_B T \ll \hbar \omega_j$, kus k_B on Boltzmanni konstant, T temperatuur, \hbar Plancki konstant ja ω_j võnkemoodi ringsagedus) üksikute võnkeribade HR faktorid on väiksemad 0,05-st, on madalal temperatuuril mõõdetud võnkespekter käsitletav kui ühe kvandi ülemineku tulemus põhiolekust või esimesest ergastatud singletsest olekust [15].

3.4. Spektraalsälgatud spekter

Homogeense neeldumisspektri uurimiseks kasutati spektraalsälgamise meetodit. Selleks mõõdeti neeldumist enne ja pärast proovi laseriga põletamist. Lainepikkuse 672,2 nm juures sälgati objekti erinevate doosidega alates $3,2 \text{ mJ/cm}^2$ -st ja lõpetades $0,57 \text{ J/cm}^2$ -ga. Joonisel 17 on toodud suhteliselt nõrga doosiga 29 mJ/cm^2 põletatud sälspekter (sinine kõver) ja tugeva doosiga $0,57 \text{ J/cm}^2$ sälgatud küllastatud spekter. Viimasel avaldusid lisaks sügavale resonantsele

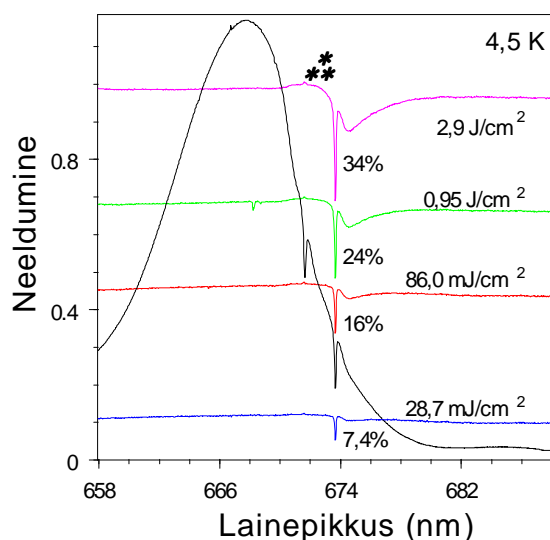


Joonis 17. 672,2 nm juures sälgatud spekter. Must pidev joon kujutab madaltemperatuurset sälgamata spektrit, sinine ja punane joon on vastavalt doosidega 29 mJ/cm^2 ja $0,57 \text{ J/cm}^2$ sälgatud spektrid.

sälgule mitmed täiendavad struktuurid. Spektraalsälgamine kasutab ära maatriksi amorfisust, ergastades vähest hulka molekule, mis pärast laseri mõju lakkamist amorfssesse tahkisesse „lõksu“ jäävad. Selliste molekulide poolt moodustub spektrisse nn antiauk, mis tuleneb neeldumise peamaksimumi molekulide ümberpaiknemisest, see on joonisel 18 tähistatud tärnikestega. Joonisel 17 olev tugev positiivne riba 649 nm juures on põhjustatud fotokeemilisest mehhanismist. Laseriga ergastamisel toimub porfüriini N-H sideme tautomeerne rotatsioon, mida varem on mõõdetud ja interpreteeritud kiirguses [24]. Samuti vastab küllastunud sälspektris esinev positiivne 620 nm riba Pheo a tautomeerse vormi

võnkeribale. Satelliitaugud a ja b on resonantse (672,2 nm) augu võnkekordused. Lisaks aukudele Q_y neeldumisribas on selgelt näha augud Q_x ribas ja selle võnkekordused, tähistatud vastavalt c ja d. Üldjuhul korrelatsioon erinevate elektronsiirete vahel puudub, mistõttu aukude teke Q_x ribal on üllatav. Siin on see siiski lihtsasti seletatav fotokeemilise sälkamise kõrvalmõjuga, s.t kahaneb neeldumine nii Q_y kui Q_x ribas. Seetõttu on ka augud c ja d palju laiemad kui resonantne auk ergastaval lainepikkusel Q_y ribas.

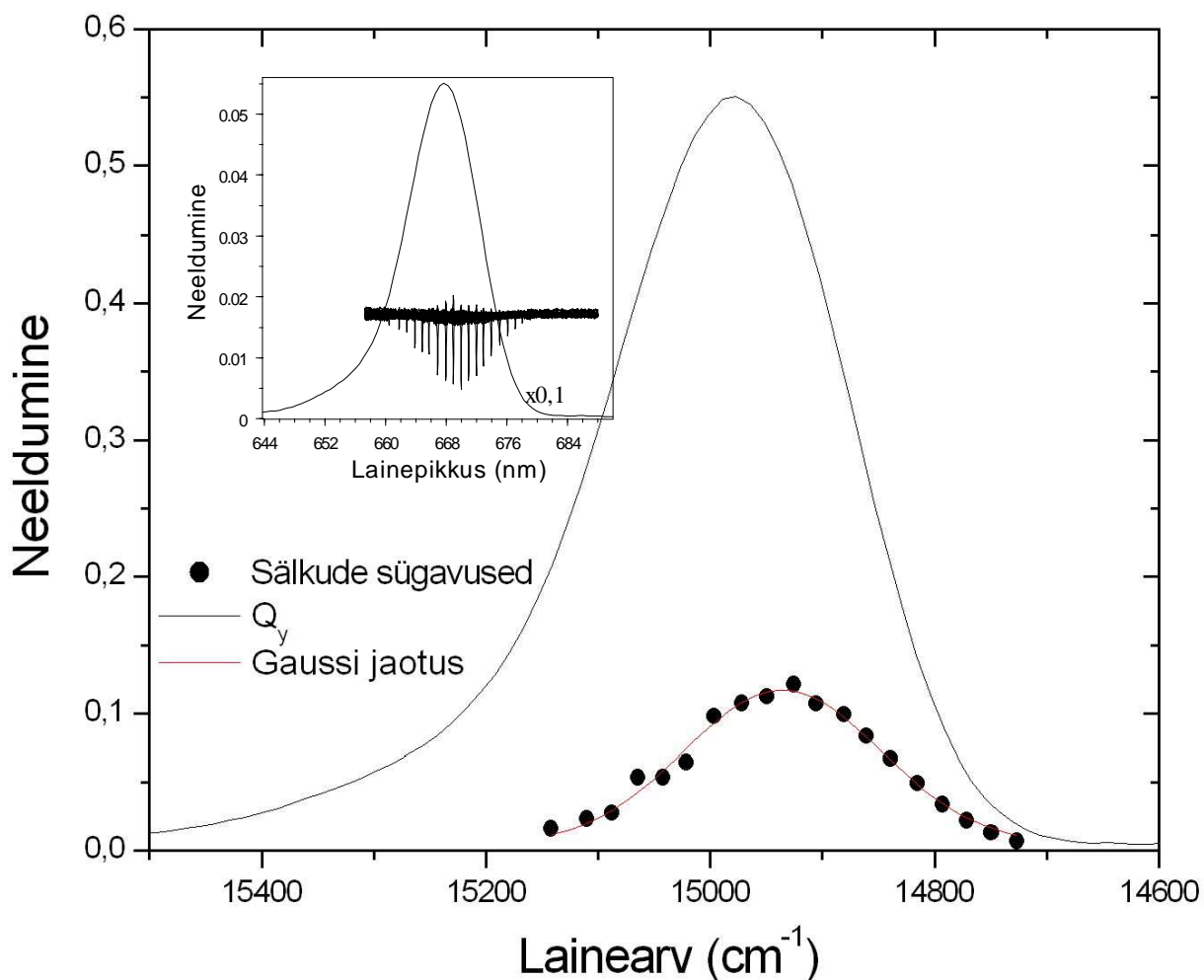
Joonis 18 kujutab samal meetodil põletatud auke parema lahutusvõimega. Sälgi 674 nm juures, neeldumiskõveral on näha nii eelnevalt 672 nm juures sälgatud auk kui ka uus auk. Joonisel on toodud erineva doosiga sälgatud spektrid, kusjuures vahe võeti järjest suurendatud doosiga sälgatud spektri ja null doosiga ehk sälkamata spektri vahel. Väikseimaks doosiks oli $3,2 \text{ mJ/cm}^2$, mis aga detekteeritavat auku ei tekitanud, joonisel seda ei näidata. Tugevamatel doosidel avaldub selgesti pseudotiib, mille suhteline maksimum võrreldes 0-0 joonega on -20 cm^{-1} juures. Tegelik foonontiiva varjab antud juhul antiauk.



Joonis 18. 674 nm juures sälgatud spekter. Must pidev joon kujutab peamaksimumi, kus on näha ka auk eelmisest põletamisest (672 nm). Värvilised jooned on eri võimsusega sälgatud spektrid. 0-0 joonest paremal on näha pseudotiib ja kolm täрни tähistavad antiauku.

3.4.1. Mõjuspekter

Spektraalsälkamise meetodil põhineb mittehomoogeense jaotusfunktsiooni leidmine mõjuspektri (*action spectrum*, ing. kl.) kaudu. Lainepikkust muutes sälgati spektrisse rida järjestikuseid auke konstantse doosiga (21 mJ/cm^2) ühtlaselt üle peamaksimumi 660 nm-st kuni 678 nm-ni. Iga kitsas foononvaba joon joonisel 19 olevas väikeses raamis vastab ühele mõõdetud sälspektrile. Sälgu sügavus on võrdeline Pheo a pigmentide arvuga antud lainepikkusel.



Joonis 19. Tavaline neeldumisspektri peamaksimum võrrelduna Gaussi jaotusega sobitatud säilkude sügavustega. Väikeses kastis sälgatud spektrid võrrelduna 10 korda vähendatud neeldumise peamaksimumiga.

Säilkude kogumi mähisjoon iseloomustab pigmentide jaotust antud maatriksis ja on heas lähenduses kirjeldatav Gaussi kujulise jaotusfunktsiooniga. Mõjuspektri poollaiuseks osutus $207 \pm 12 \text{ cm}^{-1}$, jaotuse tipp asetus $14936 \pm 3 \text{ cm}^{-1}$ juurde. Pheo a neeldumise peamaksimum vedela He temperatuuril on $14990 \pm 3 \text{ cm}^{-1}$ juures, seega on peamaksimum võrreldes jaotusfunktsiooniga nihkunud $\sim 23 \text{ cm}^{-1}$ võrra lühemate lainepikkuste poole, mis on seletatav foonontiiva mõjuga.

4. Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärkideks olid feofütiin a ekstraheerimine ja selle põhjalik uurimine optilise spektroskoopia meetodeid kasutades. Eesmärgid täideti täies mahus.

Feofütiin a eraldati päevalille (*Helianthus annuus*) leheroodudeta lehemassist kolmeastmelise kromatograafial põhineva puhastusmeetodiga. Lehemassist eraldatud pimgendilahuses muundati klorofüll soolhappega feofütiiniks ja kanti segu Silica plaadile. Plaati jooksutati sobivas eluendis ja feofütiin a eraldus teistest pigmentidest statsionaarse faasi kromatograafia teel. Feofütiin eemaldati plaadilt ja lahustati, misjärel sooritati teine puhastus uue Silica plaadiga – selle abil vähendati feofütiin a derivaatide osakaalu feofütiinis. Edasiseks puhastamiseks kasutati vedeliku-kromatograafi, mille abil õnnestus saada mõõtmisteks vajaliku puhtusastmega feofütiin a.

Feofütiin a spekter sobitus selle töö järgi Goutermani nelja orbitaali mudeliga, mille põhjal on neeldumisspektris lisaks Soret' ribale näha kaks elektroonsele üleminekule vastavat riba Q_y (669,5 nm) ja Q_x (535 nm) ning nende võnkeribad. Selgus, et feofütiini neeldumis- ja kiirgusspektri vaheline peegelsümmeetria on rikutud tugevamini kui klorofüllil spektrite puhul.

Mõõdeti neeldumise ja kiirguse temperatuurisõltuvust, kus kiirgusspektri peamaksimumil esines temperatuuri alandamisel, erinevalt ühtlaselt muutuvast neeldumisspektrist, järsk nihe spektri sinise otsa poole 170...120 K vahel. Selle järsu muutuse tingisid ilmselt pingeväljade muutused objekti maatriksis. Neeldumisspektri peamaksimumiga toimus temperatuuri vähendamisel ühtlane sininihe, kuid Q_x riba nihkus spektri punase otsa poole. Pheo a ja klorofüllil võrdlus toetas seisukohta, et lisaks maatriksile mõjutab Q_y asukohta ka porfüriiniringi sidemete arv.

Sooritati selektiivselt ergastatud fluorestsentsi mõõtmised (FLN). Selgelt eristusid kitsas ja intensiivne 0-0 joon, Gaussi-Lorentzi jaotusega sobitav lai foonontiib ja suur hulk võnkejooni. Tehti kvantitatiivne analüüs ja arvutati välja Huang-Rhys faktorid foonontiivale ($S_{ph}=0,64 \pm 0,08$), summaarsele võnkeribale ($S_{vib}=0,53 \pm 0,06$) ja igale üksikule võnkejoonele.

Viimaseks kasutatud mõõtmismeetodiks oli spektraalsälgamine. Selle meetodiga jälgiti laseriga ergastamisel tekkivaid fotofüüsikalisi ja –keemilisi muutuseid. Spektrisse 672 nm juures sälgatud augu vahetus läheduses tekkis antiauk, mis on olemuselt fotofüüsikaline ja koosneb ergastamise tulemusel maatriksis uude energetilisse olekusse lõksustunud molekulidest. 649 nm juurde tekkis aga feofütiin a tautomeeri neeldumisriba, millega kaasnes vónkeriba 620 nm juures.

Spektraalsälgamise kaudu mõjuspektri mõõtmine annab spektri mittehomogeense jaotusfunktsiooni. Käesolevas töös osutus mõjuspektri poollaiuseks $207 \pm 12 \text{ cm}^{-1}$, maksimumiga $14936 \pm 3 \text{ cm}^{-1}$ juures. Seega oli neeldumise peamaksimum jaotusfunktsiooni suhtes $\sim 23 \text{ cm}^{-1}$ nihkes.

VIITED

1. **Gouterman, M.** Spectra of porphyrins. *Journal of Molecular Spectroscopy*. 6, 1961, pp. 138-163.
2. **Sundholm, D.** Comparison of the electronic excitation spectra of chlorophyll a and pheophytin a calculated at density functional theory level. *Chemical Physics Letters*. 2000, Vol. 317, 6, pp. 545-552.
3. **L. M. C. Barter, J. R. Durrant, D. R. Klug.** A quantitative structure-function relationship for the Photosystem II reaction center: Supermolecular behavior in natural photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003, Vol. 100, 3, pp. 946-951.
4. *Topics in photosynthesis*. **Renger, G.** [ed.] J. Barber. Amsterdam : Elsevier, 1992, pp. 45-99.
5. **Klimov, V.V.** Discovery of pheophytin function in the photosynthetic energy conversion as the primary electron acceptor of Photosystem II. *Photosynthesis Research*. 2003, Vol. 76, pp. 247-253.
6. **R. Jankowiak, J. M. Hayes, G. J. Small.** Spectral hole-burning spectroscopy in amorphous molecular solids and proteins. *Chemical Reviews*. 1993, Vol. 93, 4, pp. 1471-1502.
7. **J. M. Hayes, R. Jankowiak, G. J. Small.** Persistent Spectral Hole-Burning: Science and Applications. Springer-Verlag. 1988, pp. 153-202.
8. **J. Pieper, J. Voigt.** Application of high-resolution spectroscopy investigating the energy level structure and electron-phonon coupling of the light-harvesting complex II of green plants. Humboldt-Universität zu Berlin, 2000.
9. **A. A. Gorokhovski, R. K. Kaarli, L. A. Rebane.** *Journal of Experimental and Theoretical Physics*, 1974, Vol. 20, p. 216.
10. **B. M. Kharlamov, R. I. Personov, L. A. Bykovskaya.** *Optics Communications*, 1974, Vol. 12, p. 191.
11. **R. A. Avarmaa, K. K. Rebane.** High-resolution optical spectra of chlorophyll molecules. *Spectrochimica Acta*. 1985, Vol. 41A, 12, pp. 1365-1380 .
12. **L. Shu, G. J. Small.** 1990, *Journal of the Optical Society of America*, Vol. B9, p. 724.
13. **R. Jankowiak, M. Reppert, V. Zazubovich, J. Pieper, T. Reinot.** Site selective and single complex laser-based spectroscopies: a window on excited state electronic structure,

excitation energy transfer, and electron-phonon coupling of selected photosynthetic complexes. *Chemical Reviews*. 2011, Vol. 111, 8, pp. 4546-4598.

14. **Hannah E. Wagie, Peter Geissinger.** Hole-Burning Spectroscopy as a Probe of Nano-environments and Processes in Biomolecules: A Review. *Applied Spectroscopy*. 2012, Vol. 66, 6, pp. 609-627.

15. **M. Rätsep, J. Linnanto, A. Freiberg.** Mirror symmetry and vibrational structure in optical spectra of chlorophyll a. *The Journal of Chemical Physics*. 2009, Vol. 130.

16. **Camiel Eijkelhoff, P. Dekker.** A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin a and β -carotene contents of isolated Photosystem II reaction center complexes. *Photosynthesis research*. 1997, Vol. 52, 1, pp. 69-73.

17. **I. Renge, R. Van Grondelle, J. P. Dekker.** Matrix and temperature effects on absorption spectra of β -carotene and pheophytin a in solution and in green plant photosystem II. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 1996, Vol. 96, 1, pp. 109-121.

18. **Vardhani, P. Ashritha.** *Chromatography and spectroscopy based approaches in the study of functional plant constituents*. Laila Implex R&D center , 2010.

19. **M. Fragata, B. Norden, T. Kurusev.** *Photochemistry and Photobiology*. 1988, Vol. 47, p. 203.

20. **J. Hasegawa, Y. Ozeki, K. Ohkawa, M. Hada, H. Nakatsuji.** Theoretical study of the excited states of chlorin, bacteriochlorin, pheophytin a, and chlorophyll a by the SAC/SAC-CI method. *The Journal of Physical Chemistry B*. 1998, Vol. 102, 7, pp. 1320-1326.

21. **Gonzalo Angulo, Guenter Grampp, Arnulf Rosspeintner.** Recalling the appropriate representation of electronic spectra. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2006, Vol. 65, 3, pp. 727-731.

22. **Margus Rätsep, Arvi Freiberg.** Electron-phonon and vibronic couplings in the FMO bacteriochlorophyll a antenna complex studied by difference fluorescence line narrowing. *Journal of luminescence*. 2007, Vol. 127, 1, pp. 251-259.

23. **Rebane, Karl Karlovich.** *Impurity Spectra of Solids: Elementary Theory of Vibrational Structure*. New York : Plenum Press, 1970.

24. **K. Muring, R. Avarmaa.** *Chemical Physics Letters*. 1981, Vol. 81, p. 446.

SUMMARY

The extraction and spectroscopy of pheophytin *a*

The aim of this study was to establish a method for the extraction of pheophytin *a* (Pheo *a*) and to thoroughly explore its spectroscopic properties.

Pheophytin *a* was extracted from the leaves of common sunflower (*Helianthus annuus*) through a three-step process based on chromatographic methods. The chlorophyll in the pigment solution derived from sunflower leaves was transformed into pheophytin by adding sodium chloride, after which the solution was applied to a Merck Silica plate using a microcapillary. The elution of the plate extracted pheophytin *a* from other pigments present in the solution. Pheo *a* was removed from the plate and dissolved in methanol and once again developed with a different eluent on a Silica plate, which removed the majority of unwanted pheophytin *a* derivatives. The final step of the extraction process utilized an HPLC system. The liquid chromatography provided a suitably homogenous extract for the spectroscopic measurements.

Fluorescence emission and absorption spectra of Pheo *a* in triethylamine were measured under different temperature conditions. Fluorescence narrowing techniques were utilized to study interactions between pheophytin *a* and a glassy triethylamine matrix at 4.5 Kelvin degrees. Measurements at low temperatures were carried out using a cryostat whereas a closed cuvette was used at room temperature.

The measured pheophytin *a* spectra corresponded with Gouterman's four-orbital model. Two bands corresponding to true electron transitions were observed in the absorption spectra, Q_y and Q_x at 669.5 nm and 535 nm respectively, in addition to the Soret band. Electron transitions were accompanied by vibrational changes that were visible in the absorption spectra. Absorption and fluorescence spectra did not display mirror symmetry.

Experiments were carried out to measure the temperature dependence of the absorption and fluorescence emission spectra, where the primary maximum of the fluorescence spectra displayed a sharp blueshift between 160 K and 100 K, probably caused by changes in the tension field of the matrix. Absorption spectra showed no such sharp shifts: the Q_y band displayed a subtle blueshift while the Q_x band shifted towards the red side of the spectrum while lowering the temperature. The halfwidths of both the absorption and fluorescence spectra's main bands decreased homogeneously and monotonically.

Fluorescence line narrowing techniques were applied at low temperatures. An intense zero-phonon line and a wide phonon wing that fits with a Gaussian-Lorentzian distribution were clearly visible in addition to a wide range of vibrational lines. A quantitative analysis was carried out and the Huang-Rhys factors were calculated for the phonon wing ($S_{ph}=0.64 \pm 0.08$) and the vibrational part of the fluorescence spectra ($S_{vib}=0.53 \pm 0.06$) as well as for the individual vibrational lines.

The last method used to explore the spectral properties of pheophytin *a* was spectral hole-burning. This method revealed photophysical and photochemical changes in the sample caused by excitation with a laser. A hole burned at 672 nm was accompanied by an anti-hole, a photochemical formation that consists of molecules trapped in a new energetic state after being excited with a laser. At 649 nm an absorption band of a tautomeric pheophytin *a* was revealed, accompanied by a vibrational band at 620 nm.

Hole-burning spectroscopy was used to study the inhomogeneous distribution function (IDF) of Q_y band by measuring an action spectrum. The width (full width at half maximum) of IDF turned out to be $207 \pm 12 \text{ cm}^{-1}$, while the maximum was located at $14936 \pm 3 \text{ cm}^{-1}$. The Q_y band of pheophytin *a* is shifted by $\sim 23 \text{ cm}^{-1}$ in respect to the maximum of IDF.

Tänuavaldused

Suurimad tänuavaldused juhendajatele Margus Rätsepale ja Arvi Freibergile, tänu kellele see töö võimalikuks osutus. Soovin tänada ka Eero Taltsi, kes juhendas feofütiini ekstraheerimismeetodi väljatöötamist.

LISAD

Lisa 1. Feofütiin a võnkesagedused ja vastavad Huang-Rhys faktorid.

Nr	Tipu asukoht 1/cm	% vibroonsest alast	HR faktor
1	253	3,26208	0,01745
2	268	0,56638	0,00303
3	280	0,23567	0,00126
4	295	0,39678	0,00212
5	308	0,17770	0,00095
6	344	3,23324	0,01730
7	368	0,35198	0,00188
8	377	0,36055	0,00193
9	385	0,58841	0,00315
10	402	0,32051	0,00171
11	411	0,16341	0,00087
12	429	0,44735	0,00239
13	438	0,25832	0,00138
14	447	0,15397	0,00082
15	467	0,15560	0,00083
16	475	0,15714	0,00084
17	482	0,19417	0,00104
18	494	0,21260	0,00114
19	516	0,99668	0,00533
20	542	0,35219	0,00188
21	553	0,09295	0,00050
22	568	0,51560	0,00276
23	586	0,39156	0,00209
24	603	1,05097	0,00562
25	623	0,32168	0,00172
26	630	0,23739	0,00127
27	643	0,28678	0,00153
28	670	2,26385	0,01211
29	680	1,52336	0,00815
30	694	0,94114	0,00504
31	715	0,56864	0,00304

32	725	0,80648	0,00431
33	733	1,30244	0,00697
34	745	2,12071	0,01135
35	758	0,72131	0,00386
36	774	1,36768	0,00732
37	787	0,48814	0,00261
38	797	0,51665	0,00276
39	804	0,31963	0,00171
40	814	0,30743	0,00164
41	819	0,29727	0,00159
42	832	0,28507	0,00153
43	844	0,49922	0,00267
44	852	0,57712	0,00309
45	886	1,47622	0,00790
46	898	1,86393	0,00997
47	915	1,39330	0,00745
48	933	0,26443	0,00141
49	946	0,42161	0,00226
50	960	0,57411	0,00307
51	985	7,63753	0,04086
52	1034	5,75446	0,03079
53	1053	0,86249	0,00461
54	1062	0,58987	0,00316
55	1077	1,04178	0,00557
56	1092	3,89345	0,02083
57	1126	2,78004	0,01487
58	1136	3,21561	0,01720
59	1156	2,64638	0,01416
60	1169	2,04348	0,01093
61	1202	1,65915	0,00888
62	1211	0,80322	0,00430
63	1225	2,00921	0,01075
64	1245	2,81740	0,01507
65	1265	0,67947	0,00364
66	1274	0,57169	0,00306
67	1280	0,74973	0,00401
68	1295	0,45467	0,00243
69	1303	0,49884	0,00267
70	1311	0,34960	0,00187

71	1320	0,27905	0,00149
72	1329	0,38805	0,00208
73	1348	1,58806	0,00850
74	1365	1,11412	0,00596
75	1372	0,77978	0,00417
76	1385	0,44957	0,00241
77	1394	0,43001	0,00230
78	1404	0,50787	0,00272
79	1414	0,63145	0,00338
80	1434	0,62431	0,00334
81	1445	0,37288	0,00199
82	1450	0,57658	0,00308
83	1460	0,45521	0,00244
84	1474	0,39808	0,00213
85	1477	0,27333	0,00146
86	1486	0,39938	0,00214
87	1498	0,75779	0,00405
88	1506	0,66627	0,00356
89	1522	0,49646	0,00266
90	1538	2,07114	0,01108
91	1556	0,68746	0,00368
92	1568	0,58067	0,00311
93	1583	0,98252	0,00526
94	1588	0,80924	0,00433
95	1598	0,42374	0,00227
96	1610	0,31579	0,00169
97	1616	0,30137	0,00161
98	1627	0,52885	0,00283
99	1640	0,39210	0,00210
100	1650	0,19814	0,00106
101	1660	0,35432	0,00190
102	1672	0,25097	0,00134
103	1681	0,22159	0,00119
104	1689	0,30919	0,00165
105	1697	0,38383	0,00205
106	1705	0,55079	0,00295
107	1719	0,25109	0,00134
108	1724	0,15794	0,00084
109	1732	0,08455	0,00045

110	1742	0,19714	0,00105
111	1750	0,21381	0,00114
112	1756	0,19392	0,00104
113	1765	0,29761	0,00159
114	1782	0,31056	0,00166
115	1794	0,15196	0,00081
116	1801	0,15200	0,00081
	Summa		0,535

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina _____ Renata Muru _____
(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: _____ 29.07.1989 _____)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Feofütiin a ekstraheerimine ja spektroskoopia

(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on _____ Margus Rätsep, Arvi Freiberg _____,
(*juhendaja nimi*)

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus/Tallinnas/Narvas/Pärnus/Viljandis, **26.05.2013**